

# 2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080015  
參展科別 生物化學  
作品名稱 探討粒線體如何參與調控細胞內鈣離子訊息傳遞  
得獎獎項 大會獎 二等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學  
指導教師 蔡丰喬、許一懿  
作者姓名 呂宜董、徐子涵

關鍵詞 內質網-細胞膜連接點 (ER/PM-junctions)、  
鈣池調控鈣離子內流 (store-operated Ca<sup>2+</sup> entry,  
SOCE)、鈣離子

## 作者簡介



我們是徐子涵(左)和呂宜董(右)，目前就讀北一女中數理資優班。因為覺得生物既神秘又有趣，當初在選擇專研組別時，毫不猶豫便選擇了生物組。進行專研的過程中，我們遇到了許多困難，但經過討論與互相扶持，再加上實驗室學長姐和老師的協助，最後才終於完成這項專題，真的很謝謝他們。這次有幸來到國際科展，希望能透過與他人交流，拓展自己的視野。

## 摘要

鈣池調控鈣離子內流(store-operated calcium entry, SOCE)是非興奮性細胞中最主要的鈣離子通道。當內質網缺乏鈣離子時，位在內質網上的 STIM1(Stromal interaction molecule 1)便會改變構型與在細胞膜上的 ORAI1(Calcium release-activated calcium channel protein1)接合，激活 SOCE 的路徑。近來的研究顯示，粒線體會影響 SOCE 的活性。已知平均有 5%-20%的粒線體藉由連繫蛋白與內質網相連。又已知內質網在缺乏鈣離子時會移動至細胞膜附近，故我們認為粒線體有很大的機率藉由連繫蛋白與內質網一同移動至細胞膜並透過吸收鈣離子的機制來調控 SOCE 的活性。

在使細胞表現特定螢光蛋白的前提下，我們透過活體細胞攝影來觀察特定對象(粒線體、粒線體內鈣離子)的動態變化。

從實驗結果中我們發現：當 SOCE 被激活後，粒線體會移動至 SOCE 發生處且較靠近 STIM1。又絕大部分移動至 SOCE 發生處的粒線體同時也會吸收鈣離子。

過去的研究已證實，當粒線體與內質網之間缺乏鈣離子時，SOCE 的活性會降低，且當粒線體內膜的主要鈣離子通道 MCU(Mitochondria calcium uniporter)缺乏時，亦會導致相同的結果。又從我們的實驗可知當 SOCE 被激活時，粒線體會移動至 SOCE 發生處並吸收鈣離子。綜合上述，我們可以推論以下機制，當細胞內的 SOCE 被激活時，粒線體會藉由連繫蛋白與內質網一同移動至 SOCE 發生處，同時以吸收鈣離子的方式來調控 SOCE 的活性以及細胞內的鈣離子濃度。

## Abstract

Store operated calcium entry(SOCE) is the major calcium influx in non-excitabile cells. When endoplasmic reticulum(ER)  $Ca^{2+}$  is low, the  $Ca^{2+}$  sensor STIM1 on ER undergo oligomerization and combine with ORAI1 to activate SOCE. Besides, recently research

showed that mitochondrial calcium regulation could impact SOCE. The percentage of mitochondrial connecting with ER is around 5%~20%. This ER-mitochondria connection and the ability of ER translocate to plasma membrane allow mitochondria distribute to ER/PM junction. We thus hypothesize that mitochondria may follow through ER by tethering protein to around SOCE, and uptake calcium.

We established mitochondrial calcium live cell platform by using confocal microscopy to observe certain object we transfect with fluorescent proteins.

From the results we found out that when SOCE is activated, mitochondria translocate toward SOCE component. Comparing to ORAI1 they tend to move more closely to STIM1. From those who translocate toward SOCE component, we further notice that most of them uptake calcium afterward.

The recent research has revealed that when knocking down tethering protein between mitochondria and ER lead to hinder the SOCE activation. Furthermore, our results show that when SOCE is activated, mitochondria translocate to SOCE component through ER by tethering protein, and uptake calcium around SOCE. Thus we surmise that, as SOCE is activated, mitochondria may move toward SOCE component near STIM1 and impact its activity and cellular calcium homeostasis by gaining calcium.

# 壹、前言

## 一、研究背景介紹

### (一) Store-operated $\text{Ca}^{2+}$ entry (SOCE)

SOCE 是由細胞膜上的鈣離子通道蛋白 ORAI1 和內質網上的 STIM1 共同構成的一種機制，藉由 STIM1 上的 CAD 區域和 ORAI1 緊密聯接，鈣離子便能被補充到細胞質中。

(圖 1)

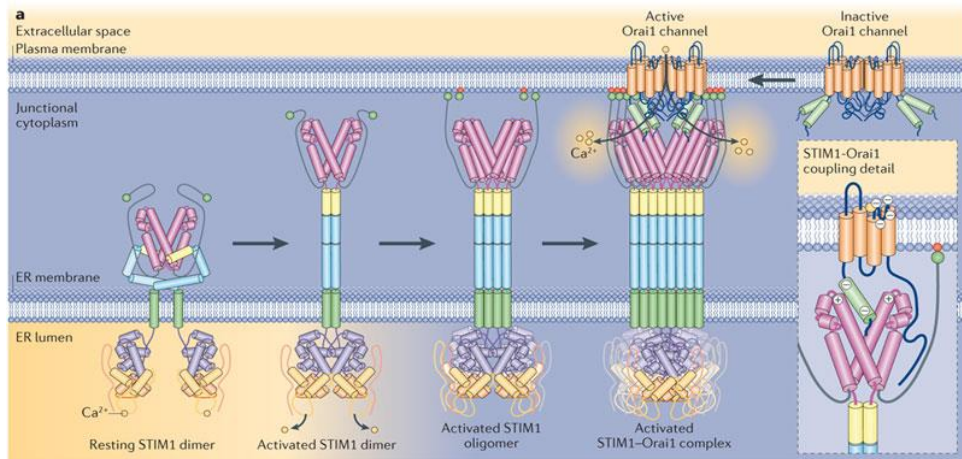


圖 1. SOCE 的機制圖

### (二) 螢光共振能量轉移技術(FRET)

FRET 是兩發光團能量上的轉移。由於兩種螢光蛋白的光譜有部分重疊，所以當 GFP 與 YFP 蛋白距離小於 10nm，GFP 的發射的光便會被 YFP 吸收，並激發 YFP 發出黃色螢光(何承訓、陳慧宇, 2017)。(圖 2)

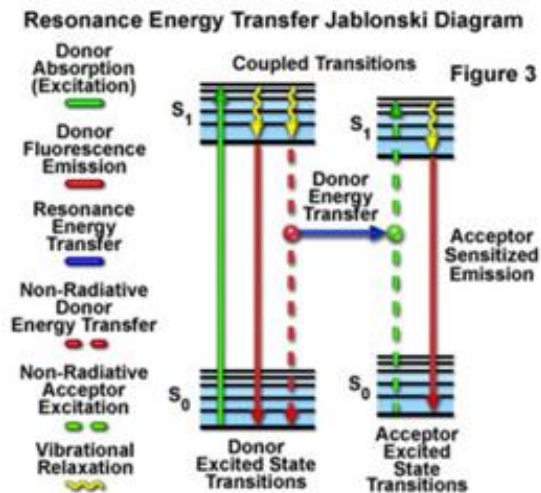


圖 2. FRET 的機制

## 二、研究動機

如果用兩個詞來形容細胞內鈣離子那便是普遍的和多才多藝的。鈣離子在細胞中主要扮演傳訊者的角色，左右細胞的代謝、生長、凋亡、移動等。其透過配體活化細胞膜上的 G 蛋白偶連受體，再藉由磷脂酶（phospholipase），讓掛在細胞膜上的 PI (4,5) P<sub>2</sub> 分離為 IP<sub>3</sub> 和 DAG。IP<sub>3</sub> 進入細胞質刺激內質網的鈣離子通道，使鈣離子釋出至細胞質中，細胞在生理狀況下的鈣離子濃度大約是 100nM，但透過這種方式，可以在短時間內將細胞質的鈣離子濃度提升大約十倍。內質網是細胞中儲存鈣離子的主要胞器，當它缺乏鈣離子時，就會移動到靠近細胞膜的位置，再透過 SOCE 途徑從細胞外攝取鈣離子。SOCE 是由細胞膜上的鈣離子通道蛋白 ORAI1 和內質網上的 STIM1 共同構成，藉由 STIM1 上的 CAD 區域和 ORAI1 緊密聯接，鈣離子便能被補充到細胞質中(Berridge et al., 2000)。

細胞中，鈣離子對粒線體也有很大的影響，其負責粒線體的代謝、ATP 的生產以及細胞死亡。粒線體主要藉由 GRP75、MFN2 和 PDZD8 連繫蛋白，拉近外膜的電壓依賴性陰離子雙向通道（Voltage-dependent anion channels）與內質網的 IP<sub>3</sub>R 鈣離子通道，使高濃度的鈣離子流至粒線體基質中。粒線體需要高濃度鈣離子是因為其內膜的鈣離子通道 Mitochondrial calcium uniporter (MCU) (圖 3)，只有在高濃度的環境下才會被啟動，打開內膜的離子通道，使鈣離子流入其中。

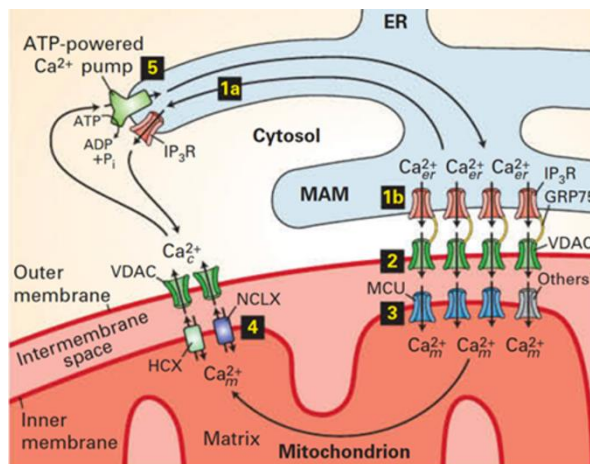


圖 3. Ca<sup>2+</sup>在細胞質、粒線體和內質網間的運動(Harvey Lodish et al., 2016)

許多研究顯示，粒線體從內質網獲取鈣離子的過程中，有黏著蛋白發揮作用，增加鈣離子傳輸的效率。例如：PDZD8 蛋白被證實能誘導內質網釋出鈣離子，使粒線體吸收 (Hirabayashi et al., 2017)；Mfn2 蛋白位於粒線體外膜，除了影響粒線體的裂變、移動，也有連接內質網和粒線體的功用(Filadi et al., 2018)。

從蔡丰喬老師實驗室目前的研究成果(未發表)中發現，利用抑制 PDZD8 或 Mfn2 表現破壞內質網和粒線體之間的連結後，可以看到內質網的鈣離子增加、粒線體獲取鈣離子能力增加、SOCE 的活性降低。又有研究指出當粒線體缺乏主要的內膜鈣離子通道 MCU 時，SOCE 的活性亦被抑制。從這個現象與上述可知，粒線體與內質網的連結不只影響彼此的鈣離子訊號傳遞，其獲取鈣離子的效率亦與細胞整體的鈣離子平衡也與其相關，然而粒線體、內質網與 SOCE 這三者的關係目前仍未被釐清，因此我們提出了假設，並想進一步探究其中原理。

### 三、研究目的

根據實驗室目前的研究成果(未發表)，以基因靜默的方式抑制內質網與粒線體間的連結，會增加內質網中的鈣離子儲存量、減少粒線體獲得的鈣離子，這表示粒線體的確仰賴其與內質網間的溝通來獲取鈣。同時實驗室也發現：位於細胞膜上的鈣池調控鈣離子內流(Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry, SOCE)竟受到了抑制。由過去文獻我們已知：SOCE 的開啟需要內質網移動到細胞膜、細胞中約有 5-20 %的粒線體會與內質網連接、細胞在正常生理狀態下存在細胞膜、粒線體與內質網共存的特殊結構。因此，我們大膽假設：粒線體

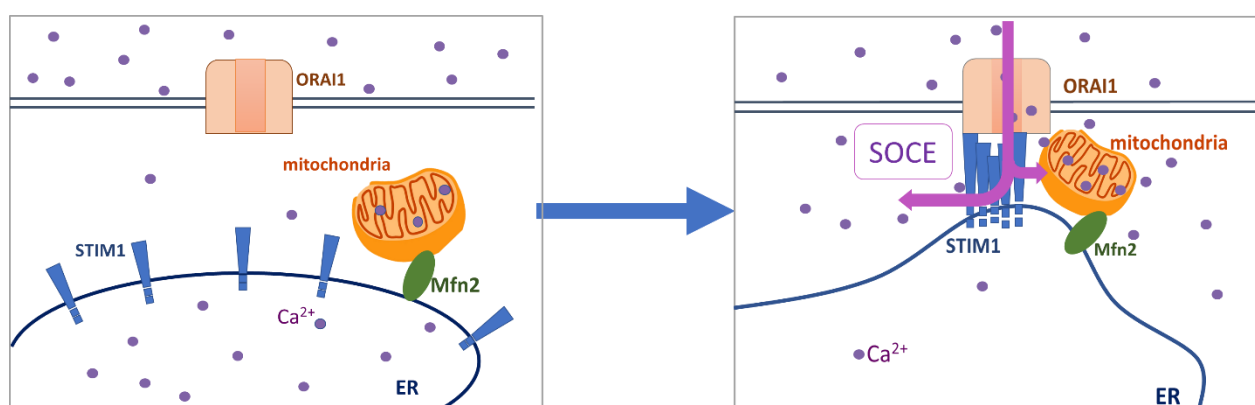


圖 4. 假設模型

可能會透過與內質網連接而移動到細胞膜，並參與調控 SOCE(圖 4)，我們會透過影像技術來驗證我們的假說。我們的研究目的有兩點：

- (一) 觀察在 SOCE 形成時，粒線體會不會移動到內質網-細胞膜複合體的位置
- (二) 觀察粒線體移動到內質網-細胞膜複合體的位置後，會不會吸收鈣離子

## 貳、研究方法或過程

### 一、研究器材及設備

- (一) 離心機：Compact Tabletop Centrifuge Model 2420
- (二) 移液管：FINNPIPETTE F1(100-1000  $\mu$ l)  
Eppendorf Research<sup>®</sup> plus(單爪 200  $\mu$ l,八爪 50-300  $\mu$ l)
- (三) 工作臺：LabGard Class II Type A2 Biological Safety Cabinet NU-543
- (四) 真空安全吸液儀：IBS Integra Biosciences Vacuboy
- (五) 螢光顯微鏡：Nikon Eclipse Ti
- (六) 倒立顯微鏡：Nikon TMS Inverted Microscope
- (七) 共軛焦顯微鏡：YOKOGAWA CSU-X1

### 二、藥品與質體

- (一) Lipofectamine3000 脂質體：轉染 DNA 進入細胞
- (二) Thapsigargin(TG)毒胡蘿蔔素：抑制 SERCA 使內質網釋放鈣離子
- (三) Trypsin 胰蛋白酶：使細胞與培養皿底分離
- (四) DMSO 二甲基亞砜：作為環境，讓 Thapsigargin 溶在其中
- (五) EGTA 乙二醇雙氨乙基醚四乙酸：作為鈣離子螯合劑，使其不會進入細胞中
- (六) poly-D-lysine：使細胞易平貼於盤底
- (七) trypan blue：藍色生物染劑
- (八) DMEM：細胞培養基
- (九) Opti-MEM：用於轉染時，可提高轉染效率



- (十) PBS 磷酸鹽緩衝生理鹽水：作為細胞的緩衝液
- (十一) ECB：細胞外緩衝液
- (十二) Antifade：防止光漂白
- (十三) Howchst：染核
- (十四) mito-LAR-GECO1.2(J.Wu et al., 2014)：粒線體的鈣離子指示劑
- (十五) mito-turquoise：紅色螢光蛋白，表現在粒線體內
- (十六) GCaMP6s-CAAX(Tsai FC et al., 2014)：會鑲在細胞膜上的螢光蛋白，可檢測細胞質內鈣離子濃度
- (十七) ORAI1-YFP：黃色螢光蛋白，標記 ORAI1
- (十八) YFP-STIM1：黃色螢光蛋白，標記 STIM1
- (十九) mCherry-STIM1：紅色螢光蛋白，標記 STIM1
- (二十) CFP-ER-PM：青色螢光蛋白，標記內質網和細胞膜的連接處
- (二十一) YFP-MAPPER：黃色螢光蛋白，標記內質網和細胞膜的連接處
- (二十二) GFP-MAPPER (Chang et al., 2013)：綠色螢光蛋白，標記內質網-細胞膜連接處
- (二十三) mito-mCherry (Olenych et al., 2007)：紅色螢光蛋白，表現在粒線體內

### 三、研究方法

(一) 實驗細胞：HEK293T (人類胚胎腎細胞系)

(二) 抽質體

1. 加入 EQ1 15mL 於核酸萃取管中
2. 離心菌液(4000g, 10min)，倒出上清液
3. 加入 R3 10mL、L7 10mL(靜置 5 分鐘)、N3 10mL 於裝菌液的離心管，倒入核酸萃取管
4. 加入 W8 10mL，滴完後拿掉上層再加入 W8 20mL
5. 滴完後將 15mL 離心管置於萃取管下，加入 E4 5mL
6. 加入 isopropanol 3.5mL 後靜置 2 分鐘後，離心 30 分鐘(12000g, 4°C)

7. 倒掉上清液後加入 70%酒精 3mL，離心 5 分鐘(12000, 4°C)
8. 倒掉上清液，靜置待微乾，用 200mL TE 回溶至微量離心管
9. 測定質體濃度

### (三) 細胞培養、將細胞種於 8 格或 96 格細胞培養玻片(8-well 或 96-well)中

1. 將培養皿中的 DMEM 吸出，加入 PBS 1mL，輕晃後吸出
2. 加入 Trypsin 1mL 後，放入培養箱中 3 分鐘
3. 加入 DMEM 1mL 沖刷盤底將細胞混和均勻，倒入離心管，離心 3 分鐘(1000rpm)
4. 倒掉上清液。若要培養就加入 DMEM 1mL 混合均勻後，取適量養在培養皿中即可。  
若要種細胞則加入 DMEM 3~5mL(視細胞量而定)，取 10  $\mu$ L 至微量離心管。
5. 加入 trypan blue 10mL 混和均勻後，取 10mL 計算細胞數
6. 每格加入 poly-D-lysine 150  $\mu$ L(8-well)或 50  $\mu$ L(96-well)後，放入培養箱中 5 分鐘，  
取出後將細胞種入

### (四) 轉染

我們利用 Lipofectamine 的化學方式將質體送到細胞內，我們嘗試過許多轉染組合，  
以下是實驗配置比例：

1. 觀察在 SOCE 形成時，粒線體會不會移動到內質網-細胞膜複合體的位置

(1) YFP-MAPPER : mito-turquoise = 1 : 1

(2) 增加陽性對照組：

CFP-ER-PM : YFP-STIM1 = 1 : 1 和 CFP-ER-PM : mito-YFP = 1 : 1

(3) CFP-ER-PM : YFP-STIM1 = 2 : 1 和 CFP-ER-PM : mito-YFP = 2 : 1

(4) CFP 表現不佳，故改為：

GFP-MAPPER : mCherry-STIM1 = 1 : 1 和 GFP-MAPPER : mito-mCherry = 1 : 1

(5) GFP-MAPPER : mCherry-STIM1 = 1 : 3 和 GFP-MAPPER : mito-mCherry = 3 : 1

(6) 發現過去拍攝的螢光訊號未重疊，故改成：

ORAI1-YFP : mito-turquoise = 1 : 1 和 YFP-STIM1 : mito-turquoise = 1 : 1

2. 觀察粒線體移動到內質網-細胞膜複合體的位置後，會不會吸收鈣離子  
(使用表現 mito-LAR-GECO1.2 的穩定細胞株)

(1) CFP-ER-PM : YFP-STIM1 = 1 : 1 和 CFP-ER-PM : mito-YFP = 1 : 1

(2) 只轉染 mito-GFP

(3) YFP-STIM1 : mito-turquoise = 1 : 1

(4) 發現過去拍攝的螢光訊號未重疊，故改成：

ORAI1-YFP : mito-turquoise = 1 : 1 和 YFP-STIM1 : mito-turquoise = 1 : 1

#### (五) 上機

1. 將 TG(實驗組)和 EGTA(實驗組，僅用一次)DMSO(對照組)用 ECB 稀釋成  $\frac{4}{1000}$  倍

2. 高倍：吸出 8-well 中的培養基，每格加入用 DMEM 稀釋成  $\frac{1}{100}$  倍的 Antifade 300  $\mu$ L，放入培養箱等候 1 小時。將 8-well 中的 Antifade 吸出，每格加入 ECB 300  $\mu$ L，吸出後再加入一次。

低倍：吸出 96-well 中的培養基，每格加入用 ECB 稀釋成  $\frac{1}{10000}$  倍的 Howchst 100  $\mu$ L 放入培養箱等候 1 小時。

3. 上機拍攝 1 分鐘後加藥，再拍 15 分鐘

## 參、研究結果與討論

一、觀察在 SOCE 形成時，粒線體會不會移動到內質網-細胞膜複合體的位置

(一) 轉染 YFP-MAPPER 和 mito-turquoise，在 4X 下拍攝 1 分鐘後，於第一組加入 EGTA 和 TG，第二組加入 EGTA 和 DMSO，第三組只加 TG，第四組只加 DMSO。由圖 5 可以看出有加 EGTA 組別的 FRET 表現量大於未加 EGTA 組別，但加入 TG 後卻看不出其表現量的變化，與我們的預期結果(加入 TG 後 FRET 表現量會增加)不符。

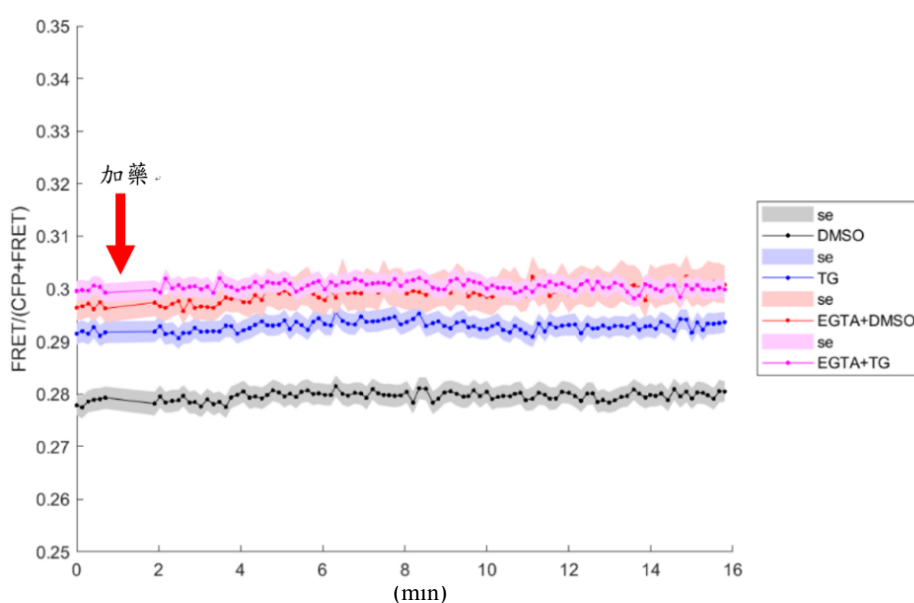


圖 5. 加入 TG 和 EGTA 對 FRET 表現量的影響

我們推測可能是因為 FRET 能量轉移效率原本就不好，故嘗試多種螢光蛋白搭配，結果仍看不太出變化。我們接著推測也可能是因為細胞在影像中的分布並不密集，而粒線體在細胞中所佔的比例通常也只有 25%，能取得的訊號量變更少，所以後來改拍攝高倍(60X) 的影像，期望透過觀察單一個別細胞內的不同的螢光訊號變化量，能更精準地看出細胞內的鈣離子的變化量值。而不會被其他外在因素如細胞分布，或者背景環境、轉染效率影響。

(二) 本系列的實驗，我們新加入了一種螢光蛋白 MAPPER(Membrane Attach Peripheral ER Label ER-PM Junction)，此蛋白可以標記內質網和細胞膜的複合體位置，同時也轉染標記粒線體的螢光蛋白。我們想看，在內質網和細胞膜複合體的對焦面下，粒線體的螢光訊號變化量。圖 6、圖 7 的連續影像動態是在 60X 下拍攝的，白色螢光處是轉染粒線體螢光蛋白的 HEK293T 細胞，經過分析後，我們發現加入 TG 之後，第二個紅色圓圈的平均訊號約莫為第一個的 1.5 倍(圖 6 對照組、圖 7 實驗組)。

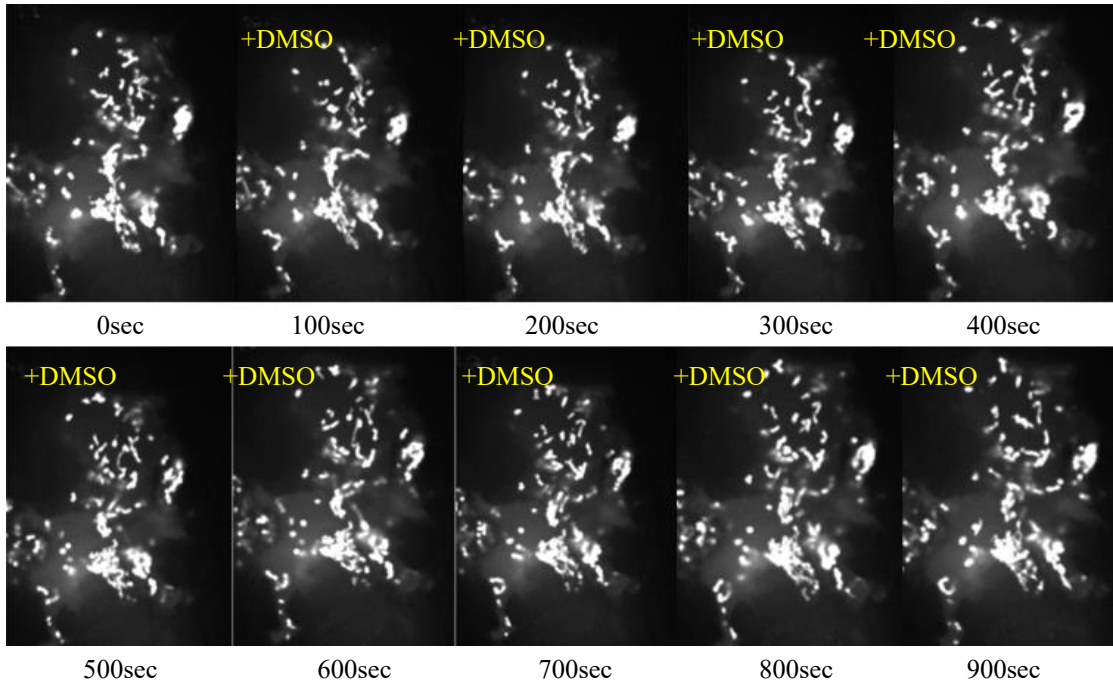


圖 6.活體細胞內，加入 DMSO 時粒線體的動態 (轉染 GFP-MAPPER 的細胞中)

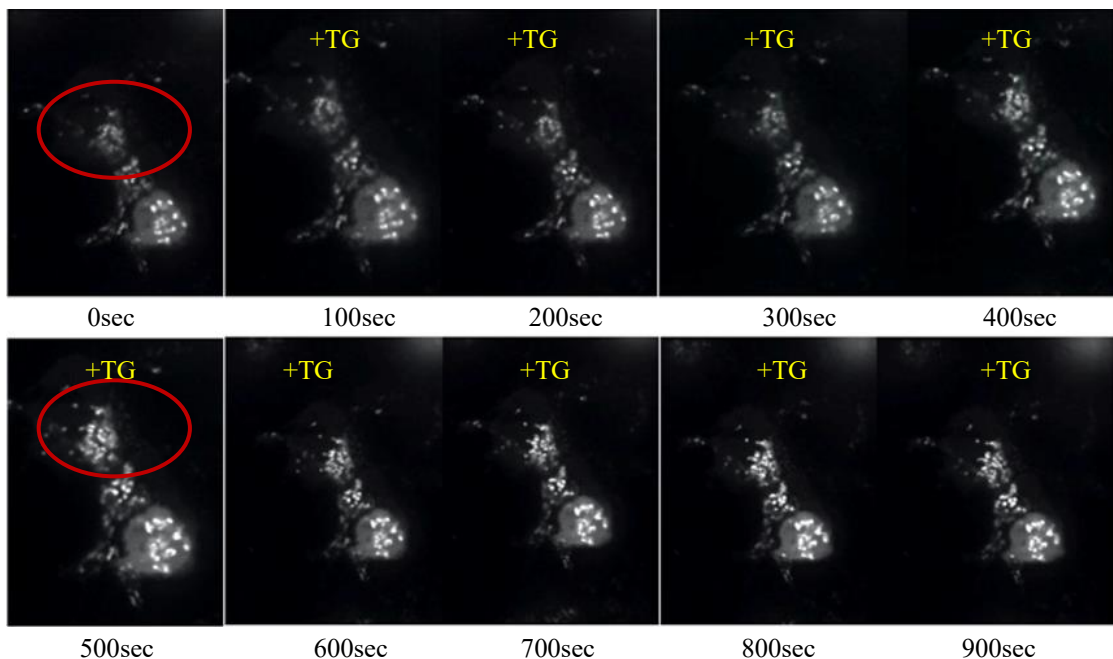


圖 7. 活體細胞內，加入 TG 時粒線體的動態 (轉染 GFP-MAPPER 的細胞中)

若單獨看粒線體的動態變化有符合我們的假說。其訊號量在加藥後有上升的趨勢。所以接下來我們將粒線體和 GFP-MAPPER 的影像疊圖，期望用數據分析的方式，找出二者的關聯性。

(三) 已知 SOCE 是由內質網的 STIM1 和細胞膜上的 ORAI1 所構成。故我們將轉染 GFP-MAPPER 和 mCherry-STIM1 的組別作為陽性對照組，來確認 MAPPER 是否真的標記到 SOCE 發生處。圖 8 利用疊圖呈現細胞螢光蛋白加入 TG 後的動態變化。然而用肉眼觀察了許多顆有轉染 MAPPER 和其他螢光蛋白的細胞之後卻都發現，兩者在加藥之後，有互相排斥的現象。從時間軸可以明顯的看出加藥後表現綠色螢光蛋白的 GFP-MAPPER 和紅色的 mCherry-STIM1 和 mito-mCherry 會從有疊合到完全的分開。

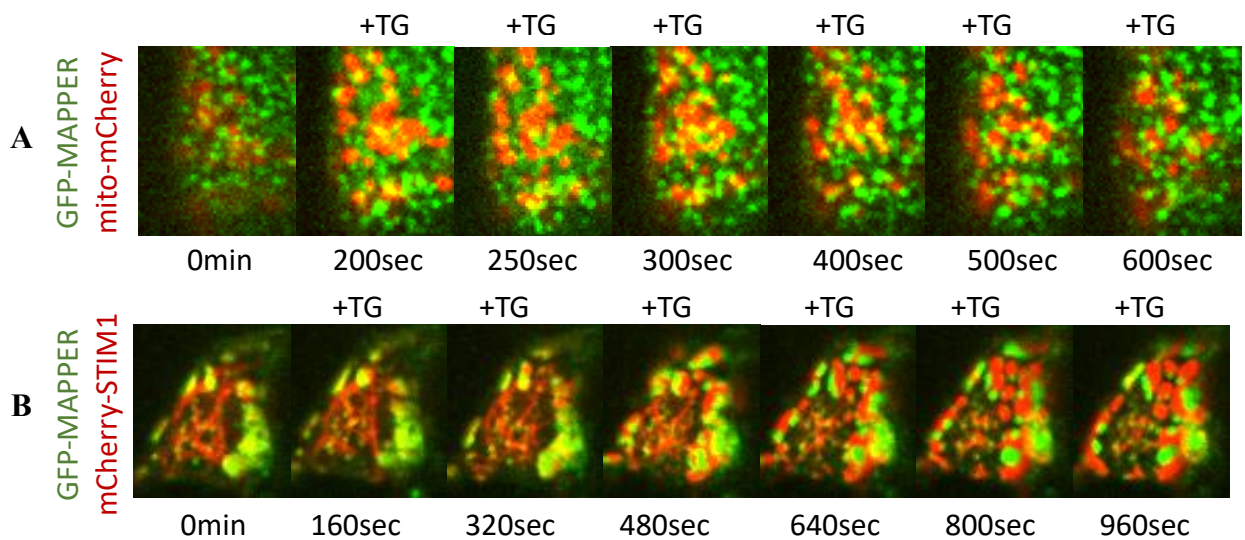


圖 8. (A)將 GFP-MAPPER 和 mito-mCherry 疊圖，螢光訊號隨著時間的變化，  
(B)將 GFP-MAPPER 和 mCherry-STIM1 疊圖，螢光訊號隨著時間的變化

我們推測這可能是螢光蛋白無法精準的標到 SOCE 發生處，或者因為粒線體的體積太大，即便粒線體真的會在加藥時跑到細胞膜-內質網複合體附近，也會把複合體形成的實心圓擠掉，造成明顯的紅綠分隔。所以決定直接改用 ORAI1-YFP 和 YFP-STIM 當作 SOCE 開啟之處，觀察粒線體的變化。



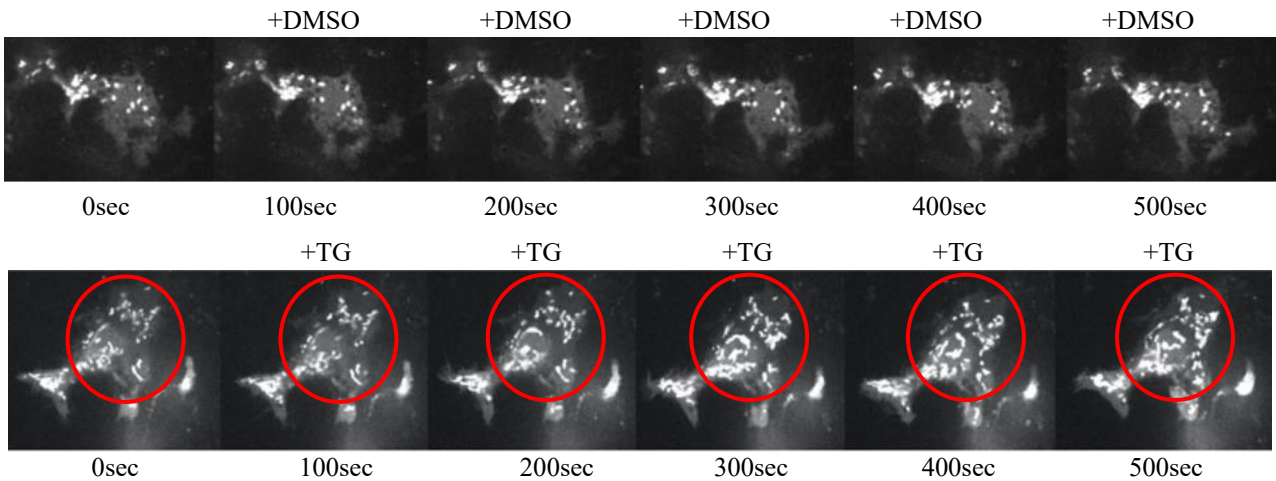


圖 11. 粒線體在加入 DMSO 和 TG 前後的訊號變化(轉染 ORAI1-YFP 的細胞中)

## 二、觀察粒線體移動到內質網-細胞膜複合體的位置後，會不會吸收鈣離子

(一) 我們在同時表現 ORAI1-YFP 和 mito-LAR-GECO1.2 的細胞株，以紅色的光激發 mito-LAR-GECO1.2，約在第二張圖時加入 TG。從連續動態影像(圖 12)中可以看出，加入 TG 的細胞，螢光訊號有增加的趨勢。

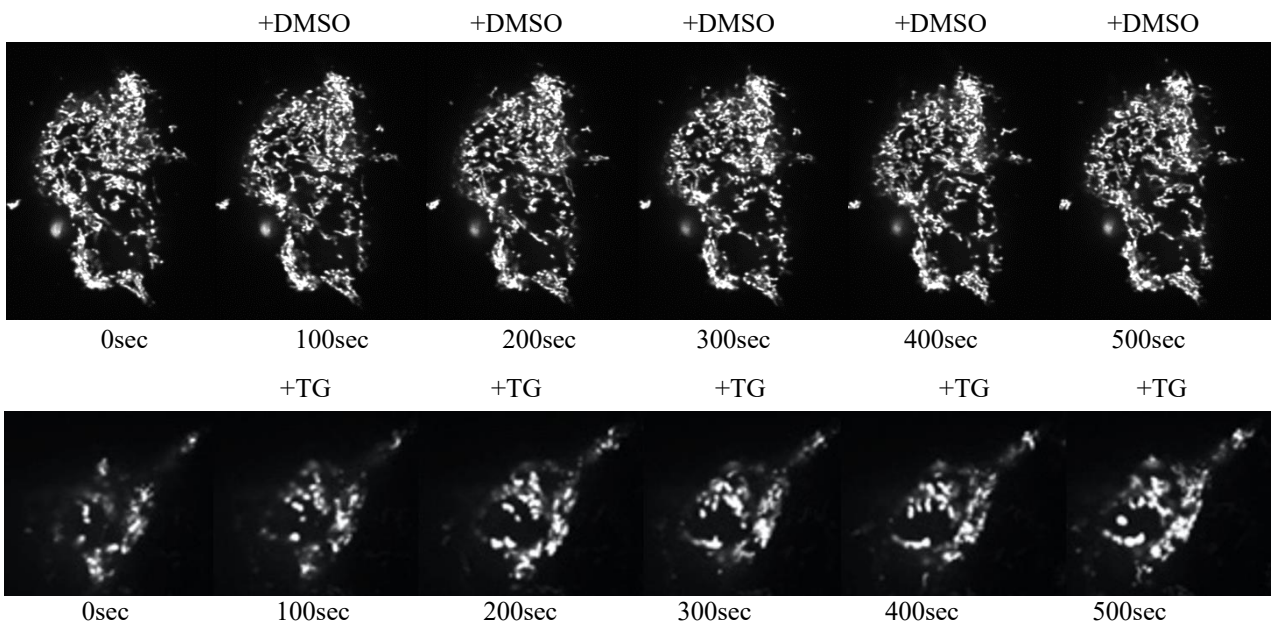


圖 12. mito-LAR-GECO1.2 在加入 DMSO 和 TG 前後的訊號變化(轉染 ORAI1-YFP 的細胞中)



(二) 我們在同時表現 YFP-STIM1 和 mito-LAR-GECO1.2 的細胞株，以紅色的光激發 mito-LAR-GECO1.2，約在第二張圖時加入 TG。從連續動態影像(圖 13)中可以看出，鈣離子訊號有些微的上升，表示粒線體移動到細胞膜能提升其鈣離子的吸收效率。

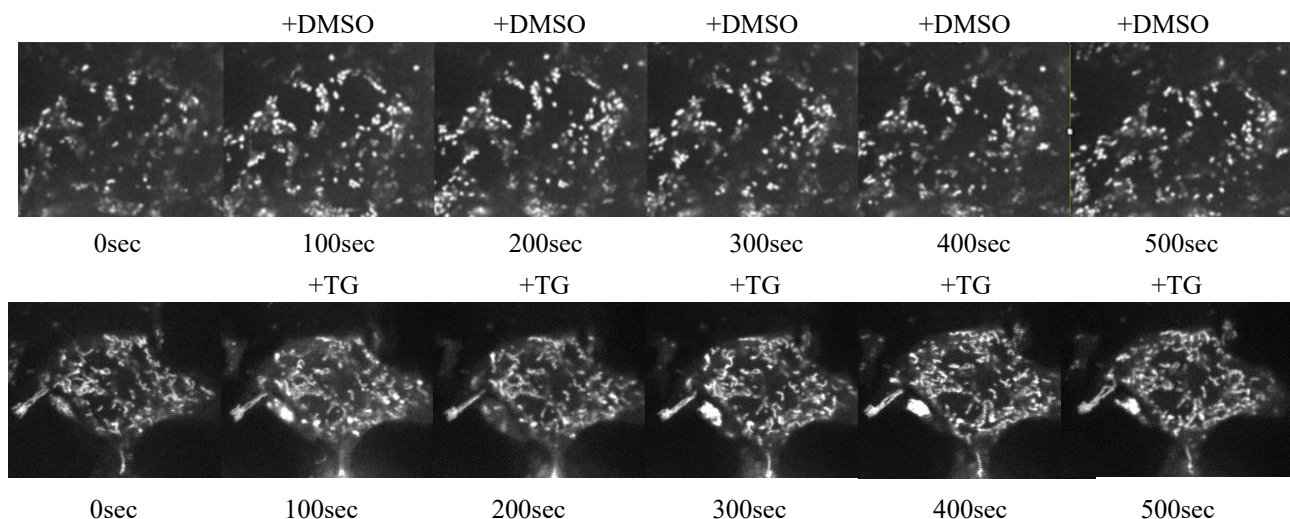


圖 13. mito-turquoise 在加入 DMSO 和 TG 前後的訊號變化(轉染 YFP-STIM1 的細胞中)

### 三、數據分析

圖 15、16、18 的資料點都是將原始資料除以初始值後相較於初始值訊號變化的幅度，這是為了避免每顆細胞大小不同，導致總訊號變化的基準有差而難以比較。已知實驗組在加入 TG 之後，不管是 ORAI1 還是 STIM1 皆會形成聚集的點狀。又已知 SOCE 是由 STIM1 和 ORAI1 所組成，於是我們將 STIM1 的點狀位置視為 SOCE 發生之處。由於我們想知道的是在 SOCE 形成時，粒線體是否會靠近內質網-細胞膜複合體(SOCE 形成的位置)以及近一步的獲取鈣離子，於是我們在分析實驗數據的過程，利用 matlab 已建立好的程式模型，只擷取點狀 SOCE 位置的訊號(圖 14)。



圖 14. 用 matlab 圈選出的點狀訊號(STIM1 mask)

然而，因為只有在 TG 加入 SOCE 形成的時候，STIM1 和 ORAI1 點狀才會出現，所以此算法並不適用於對照組。所以，對照組我們所選取的訊號範圍是整顆細胞。故為了比較時的所有控制變因皆一致，我們的實驗組除了圈選點狀區域的訊號之外，也另外計算整顆細胞訊號的折線圖。

從圖 15 可以看到加入 TG 之後，相較於對照組，STIM1 和 ORAI1 的訊號都有顯著幅度的提升。相比於抓整顆細胞訊號的圖，若有選定點狀位置，訊號也較前者，上升不少，由此可以知道，我們利用程式抓取點狀位置，確實是 STIM1 和 ORAI1 在加藥後的訊號密集處。

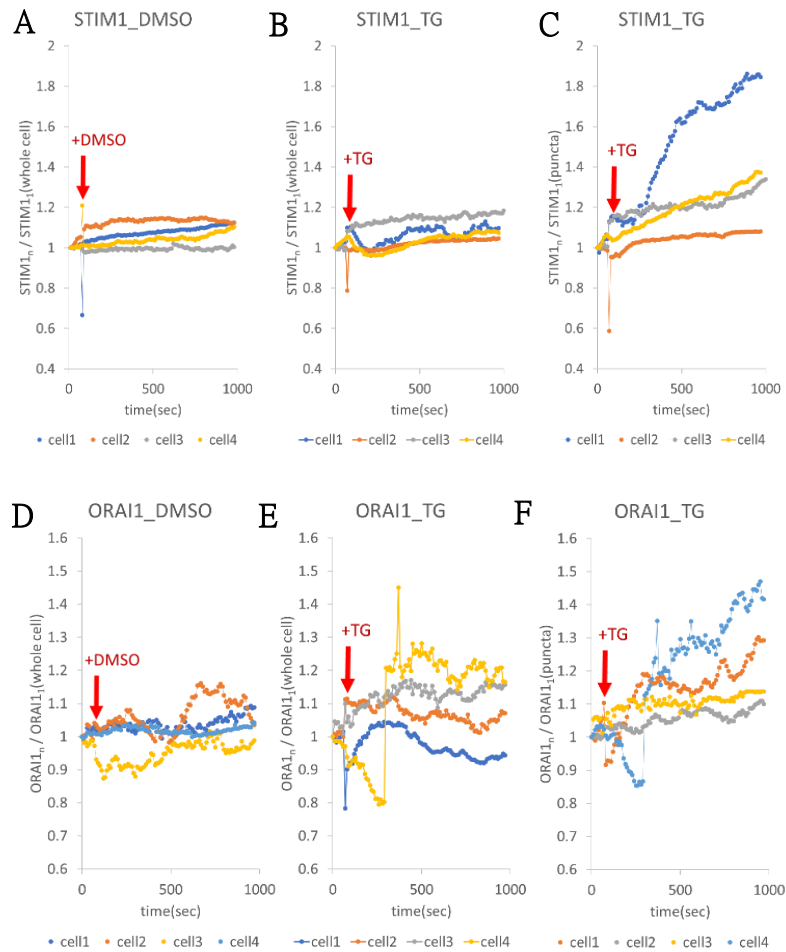


圖 15. (A~C) STIM1 的螢光訊號變化。(D~F) ORAI1 的螢光訊號變化。(A) 加入 DMSO (整顆細胞)，(B) 加入 TG (整顆細胞)，(C) 加入 TG (點狀)，(D) 加入 DMSO (整顆細胞)，(E) 加入 DMSO (整顆細胞)，(F) 加入 TG (點狀)

從圖 16 中可以發現，相較於對照組，實驗組在加藥之後，粒線體的訊號不論在標記 STIM1 還是標記 ORAI1 的細胞中皆有提升。

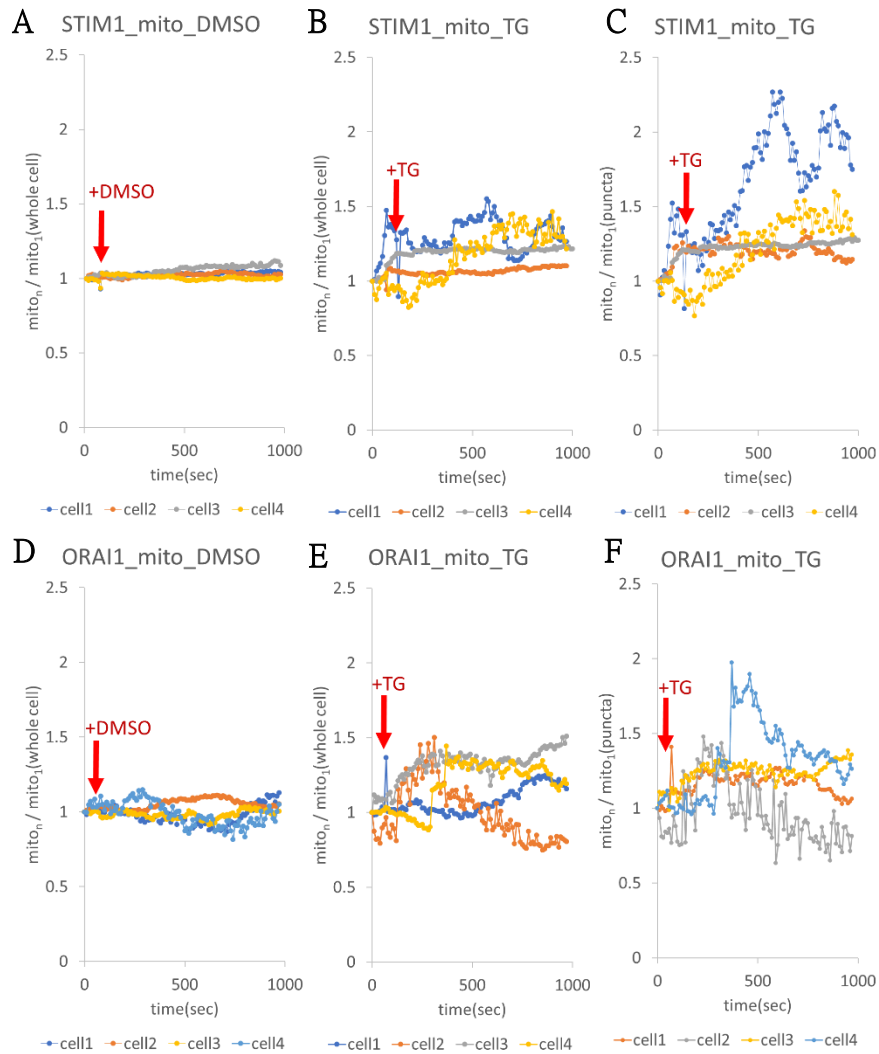


圖 16. 粒線體的螢光訊號變化，(A) 標記 STIM1 的細胞中加入 DMSO (整顆細胞)，(B) 標記 STIM1 的細胞中加入 TG (整顆細胞)，(C) 標記 STIM1 的細胞中加入 TG (點狀)，(D) 標記 ORAI1 的細胞中加入 DMSO (整顆細胞)，(E) 標記 ORAI1 的細胞中加入 DMSO(整顆細胞)，(F) 標記 ORAI1 的細胞中加入 TG (點狀)

圖 17-A 是我們統計粒線體有無移動至 SOCE 形成處的比例。此二分法的閾值是先將對照組粒線體每個時間點的訊號值除以 0 秒時的訊號值，再藉由計算訊號上升幅度最大的值與初始值之差，取眾數而得。若訊號差值高於此閾值，則相較於正常情況下的細胞，我們認為它是粒線體有移動至 SOCE 形成處的細胞。左上圖是我們將被判斷粒線體有移動至 SOCE 形成處，實驗組和對照組細胞比例的差值。從圖 17-B 可看到，在 SOCE 被激活時，相較於 ORAI1，粒線體會有更大的比例移動至 STIM1。

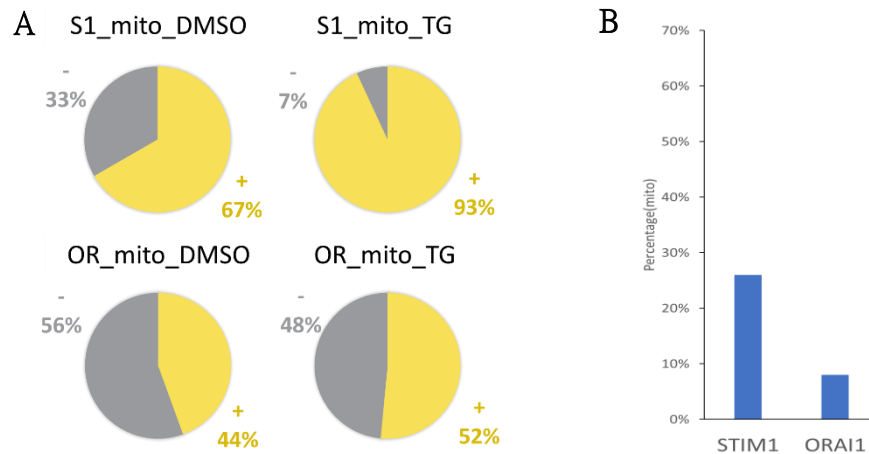


圖 17. (A)粒線體有/無移動至 SOCE 形成處的細胞比例，(B)轉染 STIM1 和轉染 ORAI1 的細胞中，對照組與實驗組粒線體移動至 SOCE 形成處的細胞比例差

從下方圖 18 中可以發現，相較於對照組，實驗組在加藥之後，鈣離子的訊號不論在標記 STIM1 還是標記 ORAI1 的細胞中皆有提升。

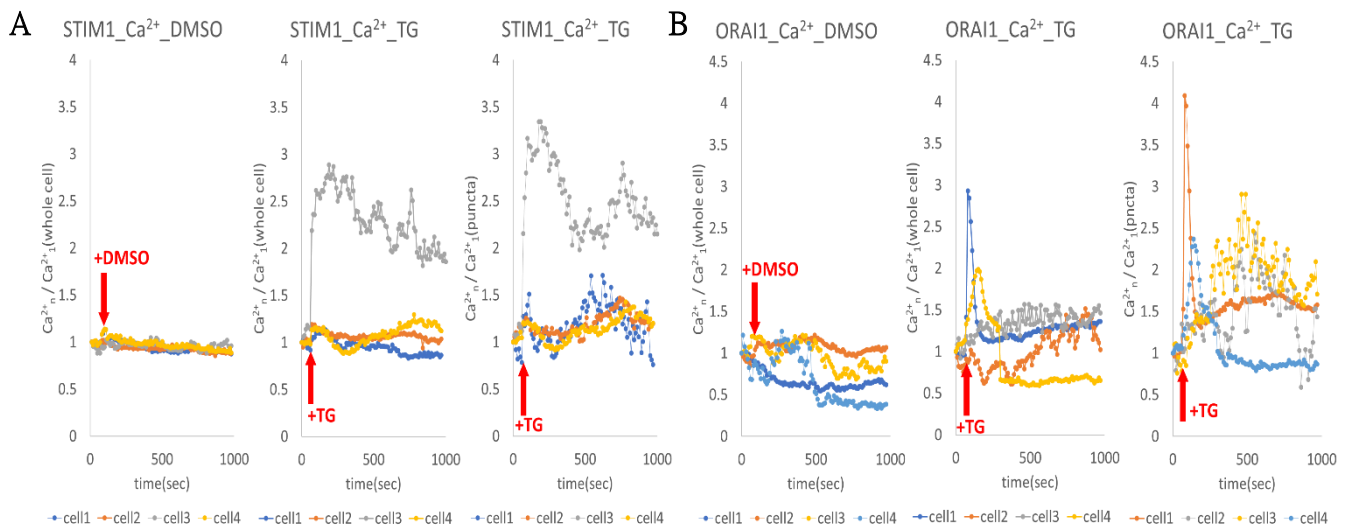


圖 18. 鈣離子的螢光訊號變化，(A) 標記 STIM1 的細胞中，加入 DMSO 的整顆細胞訊號和加入 TG 的整顆細胞與點狀部分的訊號 (B) 標記 ORAI1 的細胞中，加入 DMSO 的整顆細胞訊號和加入 TG 的整顆細胞與點狀部分的訊號

圖 19 中的所有細胞的鈣離子訊號的上升，皆是在被判斷粒線體有移動至 SOCE 發生處的前提下，才列入計算。從圖 19-A 可以看到，在加入 TG 後，實驗組的訊號皆有提升，但同時轉染 STIM1 的組別，其鈣離子有增加的細胞數多於轉染 ORAI1 的組別。

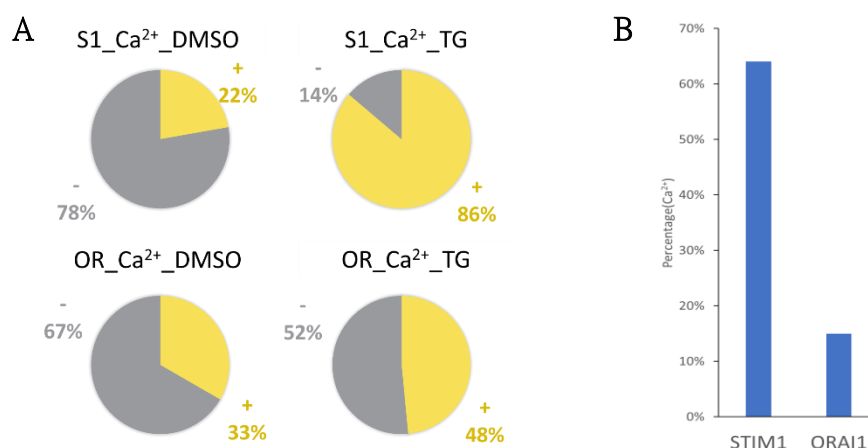


圖 19. (A)鈣離子訊號有/無上升的細胞比例，(B)轉染 STIM1 和轉染 ORAI1 的細胞中，對照組與實驗組鈣離子訊號有上升的細胞比例差

## 肆、結論與應用

### 一、結論

實驗結果顯示，透過加入 Thapsigargin(TG)使細胞開啟 SOCE 的途徑時，粒線體會靠近內質網-細胞膜複合體。我們透過轉染不同的螢光蛋白，細部的檢視粒線體與內質網-細胞膜複合體的哪一個結構較靠近。我們原先轉染的螢光蛋白是標記內質網-細胞膜複合體的螢光蛋白 MAPPER 或 ER/PM，但是由於後續實驗發現，上述兩種蛋白會與我們觀察胞器有排斥的行為，推測是因為螢光蛋白標記的胞器之間會有擠壓的可能，於是我們轉用內質網上的 STIM1 在細胞膜形成的點，以及細胞膜上的 ORAI1 作為標記 SOCE 的位置，並且比較兩者的跟粒線體的動態作用的關聯性。

相較於 SOCE 複合體的 ORAI1，粒線體較會聚集至 STIM1 的附近。我們推測這是胞器結構變形導致。因為粒線體的體積對細胞而言是較大的，當 STIM1 和 ORAI1 結合時，粒線體難以完全擠進內質網-細胞膜複合體。故因為 STIM1 的結構變成長形，相較於細胞

膜上的 ORAI1，STIM1 有較多的面積可與粒線體接觸，可能因此而導致粒線體較易聚集在 STIM1 附近。但無論粒線體較靠近哪個結構，其移動與內質網到細胞膜獲取鈣的過程，仍有一定的相關性。

又我們已知內質網與粒線體之間的連接與鈣離子的運輸有關，於是我們進一步利用粒線體內部的鈣離子指示劑發現：當我們加入 Thapsigargin(TG) 間接促成 SOCE 形成後，移動至靠近內質網-細胞膜複合體的粒線體內部鈣離子亦有提升的趨勢。從這個現象，我們可以推測粒線體與內質網在缺鈣時的交互機制如下：當粒線體和內質網同時缺乏鈣離子時，粒線體會因為接近內質網以提取鈣離子，而一起被帶至內質網-細胞膜複合體的位置。同時，因為 SOCE 被促進，於是內質網、粒線體和細胞質的鈣離子濃度便又會提升。

在分析方面，我們將每個時間點的影像訊號原始值除以初始值後，得到相較於初始值訊號變化的幅度，再以對照組的數據做為定義閾值的標準，藉此判斷粒線體是否移動至內質網-細胞膜複合體，以及粒線體內的鈣離子是否因此而增加。如果直接比較粒線體及鈣離子的訊號變化，我們發現其實兩者的變化趨勢很像，這也可以間接說明粒線體內鈣離子訊號的增加，與 SOCE 形成時粒線體移動至內質網-細胞膜複合體有關，而非完全因為內質網在 TG 作用下排出鈣離子導致的，也就是說，粒線體會藉此增加 SOCE 的活性。故我們的研究顯示粒線體在細胞內的鈣離子恆定中扮演著重要的角色。

## 二、應用

鈣離子對於細胞的生理機制以及訊號傳遞扮演重要的角色，會間接的影響到細胞增殖、凋亡、肌肉收縮等各種生命現象。我們實驗目的主要是探討粒線體、內鈣離和細胞膜的複合體是否會影響 SOCE 的效能。我們期望能藉由我們實驗所架構對於鈣離子在細胞內的調控機制，可以提供一些對鈣離子調控失衡的疾病像是神經疾病及癌症的治療參考方向。

## 伍、參考文獻

- 一、何承訓、陳慧宇，(2017)，生物體中的小分子定位系統——遺傳編碼的分子動態螢光生物感應偵測器，中央研究院週報，1634 期。
- 二、陳欣儀，(2016)，未來抗癌療新方向粒線體扮關鍵角色，環球生技月刊。
- 三、Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 1, Issue 1, pp. 11 – 21). European
- 四、Chang, C. L., Hsieh, T. S., Yang, T. T., Rothberg, K. G., Azizoglu, D. B., Volk, E., Liao, J. C., & Liou, J. (2013). Feedback regulation of receptor-induced  $Ca^{2+}$  signaling mediated by e-syt1 and nir2 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Reports*, 5(3), 813 – 825.
- 五、Filadi, R., Pendin, Di., & Pizzo, P. (2018). Mitofusin 2: From functions to disease. In *Cell Death and Disease* (Vol. 9, Issue 3, pp. 1 – 13). Nature Publishing Group
- 六、Hirabayashi, Y., Kwon, S. K., Paek, H., Pernice, W. M., Paul, M. A., Lee, J., Erfani, P., Raczkowski, A., Petrey, D. S., Pon, L. A., & Polleux, F. (2017). ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates  $Ca^{2+}$  dynamics in mammalian neurons. *Science*, 358(6363), 623 – 630.
- 七、Olenych, S. G., Claxton, N. S., Ottenberg, G. K., & Davidson, M. W. (2007). The Fluorescent Protein Color Palette. *Current Protocols in Cell Biology*, 36(1), 21.5.1-21.5.34.
- 八、Wu, J., Prole, D. L., Shen, Y., Lin, Z., Gnanasekaran, A., Liu, Y., Chen, L., Zhou, H., Chen, S. R. W., Usachev, Y. M., Taylor, C. W., & Campbell, R. E. (2014). Red fluorescent genetically encoded  $Ca^{2+}$  indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 464(1), 13 – 22.
- 九、Tsai FC, Seki A, Yang HW, Hayer A, Carrasco S, Malmersjö S, Meyer T. (2014). A polarized  $Ca^{2+}$ , diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol*, 16(2), 133-44.
- 十、Wu, S., Lu, Q., Wang, Q., Ding, Y., Ma, Z., Mao, X., Huang, K., Xie, Z., & Zou, M. H. (2017). Binding of FUN14 Domain Containing 1 with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Maintains Mitochondrial Dynamics and Function in Hearts in Vivo. *Circulation*, 136(23), 2248 – 2266.
- 十一、Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, Kelsey C. Martin. (2016). *Molecular Cell Biology*, Eighth Edition.

## 【評語】 080015

內質網是細胞中最重要的鈣離子儲存庫，其缺乏鈣離子時，會與細胞膜上的蛋白建立通道，開啟 SOCE 來補充鈣離子，而粒線體則會在需要鈣離子時靠近內質網以獲取鈣離子。而他們的實驗發現粒線體在內質網缺鈣、SOCE 開啟的情況下，會移動到內質網細胞膜複合體附近，他們進一步去探討，粒線體移動的目的及其是否參與 SOCE 的調控。對特定細胞加藥並用共軛焦顯微鏡拍攝，最後編寫程式來分析影像。

優點：鈣離子在細胞中主要擔任訊號傳遞的角色，影響許多化學反應。他們找出粒線體、內質網、細胞膜在吸收鈣離子時產生的複合體對 SOCE (內質網細胞膜上的鈣離子通道) 的影響，是很重要的發現。

缺點：討論寫到期望能藉由他們實驗所架構對於鈣離子在細胞內的調控機制，可以提供一些對鈣離子調控失衡的疾病像是神經疾病及癌症的治療參考方向，這方面可再多些說明。另外數據圖的解析度差，字太小看不清楚，不同顏色的線無解釋各代表什麼，就講出結論。

研究建議：書面報告的陳述已適度引用並註明參考文獻之處，唯圖若非作者獨自創建(例如圖 1 與 2)，宜在圖的說明處引述參考文獻。